

桃红四物汤对兔皮片移植模型 Notch4 受体表达的影响

刘卓¹ 李益亮² 张志¹ 冯海波² 曾祥晶² 孙绍裘^{2△}

[摘要] 目的:观察桃红四物汤对兔自体皮片移植模型 Notch4 受体表达的影响。方法:将 60 只新西兰大白兔随机分为 4 组,即桃红四物汤组、阻断剂组、模型组、假手术组,每组 15 只。造模后分组干预,并于术后第 2,5,8 天三个时限,从每组随机选取 5 只兔,行空气栓塞处死,切取移植皮片吻合区皮片组织,苏木精-伊红染色后在光镜下计算血管密度,采用免疫组化法测定 Notch4 受体蛋白表达情况。结果:桃红四物汤组移植区皮片的新生血管密度明显高于模型组、假手术组及阻断剂组($P<0.05$),差异有统计学意义。Notch4 受体蛋白表达含量桃红四物汤组表达量高于模型组、假手术组及阻断剂组($P<0.05$),差异有统计学意义。结论:桃红四物汤能上调组织中血管新生相关因子 Notch4 受体的表达,促进移植皮片成活。

[关键词] 桃红四物汤;Notch 信号通路;Notch4 受体;血管新生

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)05-0001-04

Effect of Taohongsiwu Decoction on Notch4 Receptor Expression in the Rabbit Skin Grafting Model

LIU Zhuo¹ LI Yiliang² ZHANG Zhi¹ FENG Haibo² ZENG Xiangjing² SUN Shaoqiu^{2△}

¹ Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

² The Second Hospital, Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005, China.

Abstract Objective: To observe the effect of Taohongsiwu decoction on Notch4 receptor expression in the rabbit autologous skin grafting model. **Methods:** All 60 New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: the Taohongsiwu decoction group, the blocker group, the model group and the sham operation group, 15 rabbits in each group. Group interventions were taken after modeling, and five rabbits were randomly selected from each group at 2nd, 5th and 8th day after operation. The rabbits were sacrificed by air embolization, and the anastomosed area skin tissues of the skin grafts were cut. The vascular density was calculated under light microscope after HE staining, the expression of Notch4 receptor protein was measured by immunohistochemistry method. **Results:** The angiogenesis density of the skin grafts of the Taohongsiwu decoction was significantly higher than that of the model group, sham operation group and blocker group ($P<0.05$). The expression level of Notch4 receptor protein in the Taohongsiwu decoction was higher than that in the model group, sham operation group and blocker group ($P<0.05$). **Conclusion:** Taohongsiwu decoction can upregulate the expression of Notch4 receptor associated with angiogenesis in tissues and promote the survival of skin grafts.

Keywords: taohongsiwu decoction; notch signaling pathway; notch4 receptor; angiogenesis

临床广泛应用具有活血化瘀功效的桃红四物汤治疗因血瘀引起的多种病症,其中皮瓣移植术后证属气滞血瘀,常以桃红四物汤活血化瘀促进皮瓣成活。前期研究^[1]表明:桃红四物汤能明显促进大鼠随意皮瓣的成活,增加皮瓣下新生微血管数量,并促进大鼠

VEGF(血管内皮生长因子)的表达。目前研究已证明,Notch 信号通路在血管重建过程中发挥重要作用^[2],Notch 信号通路包括 Notch 受体(Notch1 受体、Notch2 受体、Notch3 受体、Notch4 受体)、Notch 配体(Jagged1 配体、Jagged2 配体、Delta1 配体、Delta3 配体和 Delta4 配体)和 CSL(一种 DNA 结合蛋白)三部分^[3]。血管新生过程中 Notch 受体和配体在内皮细胞或周细胞中均有表达,在血管组织中,主要是受体 Notch4 和 Delta 样配体^[4]。本研究以兔皮片移植为模型,探究桃红四物汤干预 Notch4 受体从而调节血管新生的作用机制,为进一步明确桃红四物汤与血管

基金项目:国家自然科学基金(81373658)

湖南省教育厅科学研究项目(15C1058)

¹ 湖南中医药大学(长沙,410208)

² 湖南中医药大学第二附属医院

△通信作者 E-mail:54sunshaoqiu@163.com

新生的关系提供实验依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰大白兔 60 只,10~12 月龄,雌雄各半,体质量 2.0~4.0 kg/只,中位数 3.0 kg/只,由湖南中医药大学动物实验中心提供,实验动物许可证号 SCXK(湘)2015-0004,实验方案经过医学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验药物

桃红四物汤参考吴谦《医宗金鉴》桃红四物汤的配比:桃仁 20 g,红花 10 g,生地黄 20 g,当归 20 g,赤芍 20 g,川芎 10 g。饮片购自湖南中医药大学第二附属医院药剂科,由煎药房代煎,制成含生药 4 g/mL 的汤剂,并封包冷藏。 γ -分泌酶阻断剂 DAPT(规格 50 mg,纯度 $\geq 99.5\%$,APEX BIO 公司),头孢拉定胶囊(0.25 g,江苏亚邦强生药业有限公司)。

1.3 实验仪器

轮转石蜡切片机(徕卡 RM2235),生物组织摊片机(金迪 YD-A),冰箱(海尔 BCD-226SKA),电热恒温培养箱(上海一恒 DNP-9162),微波炉(格兰仕),研究型显微镜(Motic BA410),数码医学图像分析系统(Motic6.0)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 所有实验兔术前 6 h 禁食、禁水,用备皮刀对手术区进行备皮,并标明手术区域。麻醉前用生理盐水与戊巴比妥钠配制成 3% 戊巴比妥钠,实验时所有实验组兔固定于实验台,按 20~25 mg/kg 标准计算每只兔所需 3% 戊巴比妥钠的用量,选用 5 mL 注射器抽取相应 3% 戊巴比妥钠缓慢注射入实验兔远端左(右)耳缘静脉,麻醉完成后,兔台常规铺无菌巾单。桃红四物汤组、阻断剂组和模型组兔络合碘常规消毒手术区域后,手术剥离兔背脊柱棘突右侧 1 cm 处,从第 3 胸椎棘突起向兔尾切长 6 cm、宽 3 cm、厚约 0.5 mm 大小近长方形皮片,再于其腹部用手术刀取同样大小、厚度皮片,清理修整后移植于背部,间断缝合固定于背部,并采用加压打包包扎,腹部切口则直接拉拢缝合。假手术组仅从脊柱棘突右侧 1 cm 处,第 3 胸椎棘突起向兔尾切长 6 cm、宽 3 cm、大小近长方形皮肤切口,不游离皮肤。所有兔术后喂抗生素头孢拉定胶囊,每 8 h 灌胃 1 次,连续给药 3 d,以防止术区伤口感染。

1.4.2 分组方法 将 60 只健康新西兰大白兔实验前饲养 7 d,让其适应环境,并观察各实验用兔均健康后开始实验。将实验兔在电子天平上称质量,记录每只实验兔的质量,按体质量从小到大排序,按随机数字表法依次分为桃红四物汤组、阻断剂组、模型组、假手术组。

1.4.3 干预方法 根据人与动物体表面积换算公式^[5],桃红四物汤组实验兔灌药剂量为:桃红四物汤

5 g/kg,2 次/d。同时模型组和假手术组给予等体积的蒸馏水灌胃。阻断剂组兔予以 γ -分泌酶阻断剂 DAPT 1 mL 皮下注射,术后第 1 天起每天每只兔予以 DAPT 1 mL 皮下注射,直至取材当天。

1.4.4 标本制作方法 药物干预开始后第 2,5,8 天从每组随机选取 5 只兔,行空气栓塞处死,用无菌手术刀切取移植皮片吻合区皮片组织,将所取皮片组织分成 2 份,分别用多聚甲醛固定后待检测。

1.5 实验指标测定

一份标本制成石蜡切片,苏木精-伊红染色后在光镜下计算血管密度,以每个视野下毛细血管横断面的数量来表示;另一份标本采用免疫组化法测定 Notch4 受体蛋白表达情况,主要步骤如下:1)石蜡切片置于 67℃ 烘箱中,烘片 2 h,脱蜡至水,用 pH7.4 的 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。2)取一定量 pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液,加入微波盒中,微波加热至沸腾,将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中,中档微波处理 10 min,取出微波盒流水自然冷却,从缓冲液中取出玻片,先用蒸馏水冲洗 2 次,之后用 PBS 冲洗 2 次,每次 3 min。3)每张切片加 1 滴 3% H_2O_2 ,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。4)除去 PBS 液,每张切片加 1 滴相应的第一抗体(相应稀释倍数),室温下孵育 2 h。5)PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。除去 PBS 液,每张切片加 1 滴聚合物增强剂,室温下孵育 20 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。6)除去 PBS 液,每张切片加 1 滴酶标抗鼠/兔聚合物,室温下孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。7)除去 PBS 液,每张切片加 1 滴新鲜配制的 DAB 液(二氨基联苯胺),显微镜下观察 5 min。8)苏木素复染,0.1% HCl 分化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干后观察。

1.6 统计学方法

指标数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。数据均使用 SPSS20.0 统计软件进行分析处理。

2 结果

2.1 各组血管密度检测结果

药物干预开始后第 2,5,8 天,4 组动物移植皮片中每个视野($\times 400$)中血管数量比较,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);第 2 天阻断剂组与假手术组、模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),阻断剂组含量低于桃红四物汤组($P < 0.05$)。第 5 天阻断剂组与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),阻断剂组含量均低于模型组、桃红四物汤组($P < 0.05$);模型组小于桃红四物汤组($P < 0.05$)。药物干预后第 8 天,阻断剂组含量低于假手术组,假手术组低于模型

组,模型组低于桃红四物汤组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1.

表 1 药物干预后不同时间点 4 组动物各组血管密度检测结果($\bar{x} \pm s$,个)

组别	例数	药物干预开始后时间点		
		第 2 天	第 5 天	第 8 天
假手术组	5	5.30±0.32	5.52±0.45	5.83±0.33
模型组	5	5.31±0.21	5.86±0.61	6.31±0.19
桃红四物汤组	5	5.96±0.41	6.46±0.12	6.95±0.42
阻断剂组	5	5.21±0.12	5.32±0.42	5.42±0.31
<i>F</i>		56.34	63.54	68.72
<i>P</i>		0.004	0.006	0.003

2.2 Notch4 受体免疫组化平均光密度测定及免疫组化图

药物干预后第 2,5,8 天,4 组 Notch4 受体免疫组化平均光密度比较,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。第 2 天阻断剂组与假手术组、模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),阻断剂组含量低于桃红四物汤组(P

< 0.05)。第 5 天阻断剂组与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),阻断剂组含量均低于模型组、桃红四物汤组($P < 0.05$);模型组小于桃红四物汤组($P < 0.05$)。药物干预后第 8 天,阻断剂组含量低于假手术组,假手术组低于模型组,模型组低于桃红四物汤组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2 及图 1~3.

表 2 药物干预后不同时间点 4 组动物 Notch4 受体免疫组化平均光密度($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	例数	药物干预开始后时间点		
		第 2 天	第 5 天	第 8 天
假手术组	5	0.34±0.07	0.35±0.06	0.36±0.08
模型组	5	0.36±0.21	0.39±0.04	0.42±0.19
桃红四物汤组	5	0.48±0.61	0.45±0.06	0.57±0.07
阻断剂组	5	0.32±0.09	0.31±0.02	0.28±0.07
<i>F</i>		6.935	7.647	4.232
<i>P</i>		0.003	0.002	0.004

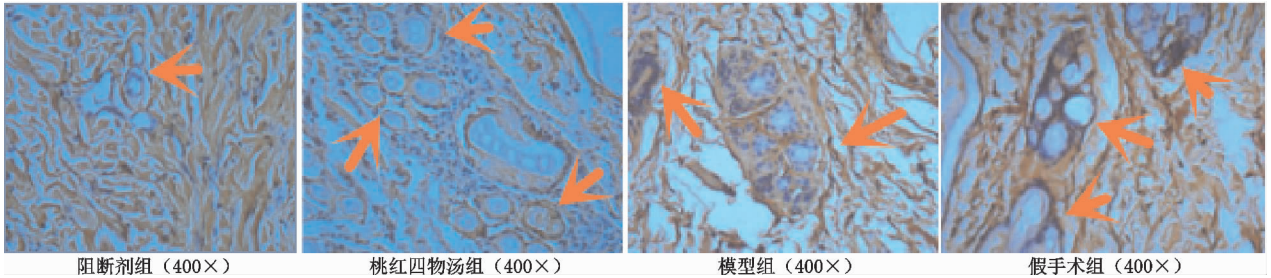


图 1 药物干预后第 2 天各组免疫组化苏木精-伊红染色图

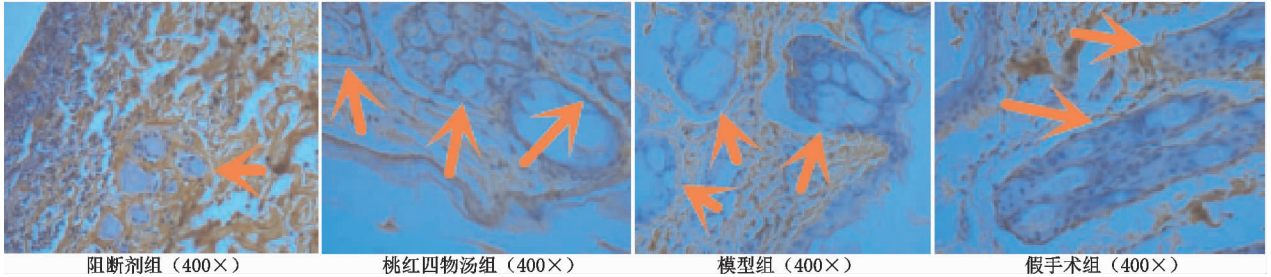


图 2 药物干预后第 5 天各组免疫组化苏木精-伊红染色图

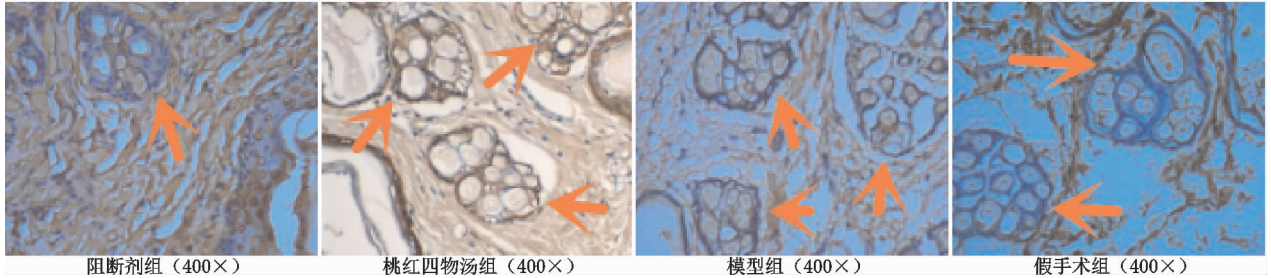


图 3 药物干预后第 8 天各组免疫组化苏木精-伊红染色图

3 讨论

自体皮片移植术是将供区皮片移植到受区,使其重新建立血运循环而存活的一项技术,是目前临床骨外科治疗皮肤缺损最常用的有效方法之一^[6]。虽然手术简单并能有效修复皮肤缺损,但是术后移植皮片坏死同样使患者遭受严重的身心痛苦和经济负担,已成为世界各国急需解决的问题。皮片移植始终是创伤领域研究的重点与热点,皮片与受区能否建立良好的血供关系是移植皮片成活的关键,受区良好的血供可以为移植皮片提供丰富的营养,促进移植皮片的成活。有研究者^[7]认为早期重建移植皮片血运是皮片成活的核心问题。最近的研究表明,皮片移植术后血管的重建一般需经历两个过程^[8]:1)血浆营养期,发生在移植后最初 48 h 内,主要是使皮片产生内源性固定;2)血管新生与血液循环的建立,移植 48 h 后血管芽在皮片与受区间活跃生长,术后 4~5 d 内这一过程完成。因此,本实验以皮片移植后第 2,5,8 天为观察时限,以免皮片移植为模型,探究桃红四物汤对 Notch4 受体表达的影响,从而揭示桃红四物汤促血管新生的作用机制。

桃红四物汤由桃仁、红花、当归、赤芍、生地、川芎六味中药组成,桃仁、红花活血祛瘀,通络消肿;川芎活血行气;当归活血补血;生地清热凉血,养阴生津以濡养皮肤;赤芍活血散瘀并助生地清除瘀血所致郁热。全方祛瘀不伤正,补益而不壅滞。通过活血化瘀,配合补血,使血脉得通,瘀血得去,新血得生,经脉通畅,肤表得以津血濡养。现代药理学研究证明,桃红四物汤不仅具有改善心功能、抗心肌缺血、抑制血小板聚集、改善血液流变学及微循环作用,而且具有抗缺氧、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血脂、增强免疫功能等多种功效^[9]。同时有研究表明,桃红四物汤在创伤愈合等方面有着重要的作用^[10],组织移植中的血管新生是再生血管化基础^[11]。移植皮片与受区建立良好的血液循环过程,包括移植皮片与受区的血管新生过程,有研究^[12]证实,某些中药的有效成分和复方可促进血管新生。同时,有研究者通过建立鸡胚绒毛尿囊膜 CAM 模型的方法对桃红四物汤进行拆方研究,观察不同药物组合及单味药对 CAM 血管生成的影响,发现该药具有抗 CAM 血管生成作用。

最近相关研究^[13]表明 Notch4 受体可促进血管新生,其正常表达是血管正常发育的必备条件,过度表达则可能导致血管发育缺陷,表达不足时可与 Notch1 受体相互代偿。而 DAPT 能够特异性地阻断 γ -分泌酶,抑制 Notch 信号通路的传导,在血管新生过程中抑制 Notch4 受体,从而抑制血管新生。因此,本实验以兔皮片移植为模型,将实验兔分为桃红四物汤组,DAPT 阻断剂组,模型组及假手术组进行比较研究,通过切取移植皮片吻合区皮片组织,经 HE 染色后在光镜下计算血管密度,采用免疫组化法测定 Notch4 受体蛋白

表达情况,发现桃红四物汤组移植区皮片的新生血管密度明显高于模型组、假手术组及阻断剂组;Notch4 受体蛋白表达含量桃红四物汤组表达量高于模型组、假手术组及阻断剂组。结果表明:在兔皮片移植模型中,应用桃红四物汤能上调移植皮片组织中血管新生相关因子 Notch4 受体的表达,促进血管新生,从而有益于移植皮片成活,为桃红四物汤应用于皮片移植术后的气滞血瘀证提供实验依据。但桃红四物汤具体是何种成分或是通过何种路径上调 Notch4 受体,以及与笔者前期相关研究^[14]表明桃红四物汤上调兔自体皮片移植模型 Delta-like4 的表达、促进血管新生是何种关系,仍需今后进一步研究。

参考文献

- [1] 周昭辉,刘甲,孙达武. 桃红四物汤对大鼠随意皮瓣成活的影响[J]. 中医药导报,2011,17(7):75-76.
- [2] Qiao L, Xie L, Shi K, et al. Notch signaling change in pulmonary vascular remodeling in rats with pulmonary hypertension and its implication for therapeutic intervention [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51514.
- [3] 李倩,胡明玉,章宏伟,等. 负压创面治疗技术对皮肤移植成活的临床观察及实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(17): 3284-3289.
- [4] 姜萌,何奔. Notch 信号对血管新生调控作用的研究进展[J]. 上海交通大学学报:医学版,2010,30(5):589-591.
- [5] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2008:48.
- [6] 刘嘉峰,钟文惠,张一鸣,等. 重组人 VEGF 基因在游离组织移植中作用的实验研究[J]. 中国美容医学,2008, 17(4):540-543.
- [7] 齐伟亚,郑大伟,张旭阳,等. 血运重建后皮瓣修薄法在股前外侧皮瓣游离移植中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志,2016,30(4):525-527.
- [8] 李倩,胡明玉,章宏伟,等. 负压创面治疗技术对皮肤移植成活的临床观察及实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(17): 3284-3289.
- [9] 李翊,彭代银. 桃红四物汤的药理学研究进展[J]. 安徽医药,2011,15(5):529-531.
- [10] 李向阳,周晓庆,禹晓东. 桃红四物汤配合手法复位与固定治疗上肢闭合性骨折及对炎症因子与预后的影响分析[J]. 陕西中医,2015,36(3):310-312.
- [11] 刘虎仙,雷永红,韩岩. Notch 信号通路在组织血管化中的作用[J]. 中国美容医学,2015,24(8):83-86.
- [12] Sengupta S, Toh SA, Sellers LA, et al. Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng[J]. Circulation, 2004, 110(10):1219-1225.
- [13] 刘卓,李益亮,张志,等. Notch4 受体对血管新生的影响[J]. 中医正骨,2016,28(6):56-58.
- [14] 林念慈,孙绍裘,李益亮,等. 桃红四物汤对兔自体皮片移植模型 Delta-like4 表达的影响[J]. 中医正骨,2015, 27(11):1-7.

(收稿日期:2016-11-01)